



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Off n l gungsschrift**
⑩ **DE 195 41 980 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
G 01 N 21/01
G 01 N 21/31
G 01 N 33/535
B 01 L 3/00

⑳ Akt nz icken: 195 41 980.4
㉑ Anmeldetag: 10. 11. 95
㉒ Offenlegungstag: 4. 4. 96

DE 195 41 980 A 1

Mit Einverständnis des Anmelders offengelegte Anmeldung gemäß § 31 Abs. 2 Ziffer 1 PatG

㉑ **Anmelder:**
Dittrich, Walter, Dr., 26122 Oldenburg, DE

㉒ **Erfinder:**
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 **Extinktionsverstärker für 96-well-Mikrotiterplatten**

⑤7 Die Erfindung besteht aus einer Kunststoffplatte mit 96 etwa 1 cm langen Röhren, die wie die Kavitäten einer 96-well-Enzym-Immun-Assay-Mikrotiterplatte angeordnet sind und in diese Kavitäten eingeführt werden können (Extinktionsverstärker). Unmittelbar vor der photometrischen Messung wird die Extinktionsverstärkerplatte über die Mikrotiterplatte gestülpt. Die Röhren tauchen in die Farbstofflösung ein und erhöhen damit die Schichtdicke bzw. die Füllhöhe der Farbstofflösung in den Kavitäten. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz resultiert daraus eine höhere Extinktion. Die Sensitivität eines ELISAs, die Reproduzierbarkeit und die Präzision der Messung wird dadurch in einfacher Weise verbessert. Die eingesetzten Mengen an Substratlösung und Stopplösung können verringert werden. Der Extinktionsverstärker ist wiederverwendbar, denkbar einfach anzuwenden, kann in beliebigen Wandstärken hergestellt werden, und führt insbesondere in niedrigen Konzentrationsbereichen zu einer Optimierung und wesentlichen Verbesserung der Leistungsfähigkeit der vorhandenen ELISA-Technik. Eine preiswerte Massenproduktion ist möglich. Durch die Einfärbung der Röhren kann darüber hinaus eine evtl. Streustrahlung zwischen den Kavitäten verhindert werden. Der Extinktionsverstärker kann bei allen Verfahren eingesetzt werden, wo Mikrotiterplatten photometrisch ausgewertet werden.

DE 195 41 980 A 1

Beschreibung

In der klinischen Diagnostik, Forschung usw. werden Mikrotiterplatten für die Durchführung von Enzymimmunoassays, bestehend aus 96-Vertiefungen mit einem Durchmesser von etwa 0,7 cm und einer Tiefe von etwa 1 cm weltweit verwendet. Die letzten Schritte eines ELISAs bestehen in der Zugabe einer Substratlösung, die von dem an einen Antikörper gekoppelten Enzym, z. B. Meerrettich-Peroxidase, zu einem Farbstoff umgesetzt wird und der abschließenden Zugabe einer Stopplösung (z. B. Schwefelsäure), die den gebildeten Farbstoff stabilisiert.

Anschließend erfolgt eine photometrische Extinktionsmessung mit einem ELISA-Reader.

Bei geringen Konzentrationen bzw. Konzentrationsdifferenzen sind die Schwankungen der Messungen oft groß und kaum von den Leerwerten zu unterscheiden. Die photometrische Messung folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz. Danach ist die Extinktion abhängig von dem molaren Extinktionskoeffizienten, der Konzentration der Farbstofflösung und der Schichtdicke der Farbstofflösung.

Beispiel: In eine ELISA-Platte werden 0,2 ml Substratlösung und nach Inkubation 0,05 ml Stopplösung gegeben und anschließend gemessen. Die Schichtdicke der Flüssigkeit in einer Vertiefung beträgt etwa 0,65 cm. Durch eine Verringerung des Volumens läßt sich die Flüssigkeitssäule in der gegebenen Kavität um ca. 30% erhöhen.

Dies kann einfach, preiswert und praktisch ohne Zeitaufwand durch eine Platte erreicht werden, die die gleichen Maße hat wie eine Mikrotiterplatte, auf der 96 etwa 1 cm lange Röhren so angebracht sind, daß dieser "Extinktionsverstärker" über die Mikrotiterplatte gestülpt wird, wobei die Röhren sich nahe an den Gefäßwandungen der Mikrotiterplatte befinden und zentral den ungehinderten Durchtritt des ELISA-Reader-Lichtstrahls ermöglichen. Die Röhren verringern das Volumen der Mikrotiterplatten und führen zu einer Erhöhung der Schichtdicke. Die Wandstärke der Röhren des "Extinktionsverstärkers" können variabel und eingefärbt sein, um Streustrahlungen zwischen einzelnen Kavitäten abzufangen. Einsatzmöglichkeiten ergeben sich bei allen photometrischen Auswertungen von Mikrotiterplatten z. B. ELISA, EIA, Zellkulturen usw.

Vorteile:

- Die Präzision der Messung wird erhöht.
- Geräte mit Photodioden von geringer Leistungsfähigkeit können präzisere Ergebnisse liefern
- Differenzen zwischen Meßwerten werden verstärkt
- Die Menge an Substratlösung und Stopplösung kann verringert werden, dadurch wird die Konzentration des gebildeten Farbstoffes erhöht
- ELISAs werden sensitiver
- Der Extinktionsverstärker kann nach der Benutzung gespült werden und ist wiederverwendbar.
- Durch variable Wandstärken des "Extinktionsverstärkers" können ELISA-Kits optimiert werden.
- Die Handhabung ist denkbar einfach
- Die Erfindung ist preisgünstig für den Nutzer
- Alle Enzym-Immunoassay-Anwender können die Erfindung ohne weitere technische Veränderungen nutzen.
- Für die Herstellung des Extinktionsverstärkers

ist etwa der gleiche Aufwand erforderlich, wie für die Mikrotiterplatte.

— Damit ist der Extinktionsverstärker für die Massenproduktion geeignet.

— Die ELISA-Platten-Technik wird in der jetzigen Form im Hinblick auf die Handhabung und die Photometer-Technik durch den Einsatz des Extinktionsverstärkers nicht verändert.

Patentanspruch

Extinktionsverstärker für 96-well-Mikrotiterplatten, dadurch gekennzeichnet, daß in die Kavitäten von 96-well-Mikrotiterplatten nach dem Pipettieren und vor der photometrischen Messung passende rohrförmige Kunststoffgebilde, bestehend aus 96 zusammenhängenden Röhren als passendes Gegenstück eingesetzt werden, deren Zweck in einer Verringerung des Volumens der Kavität und damit einer Erhöhung der Schichtdicke der Farbstofflösung besteht. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich eine höhere Extinktion. Durch eine dunkle Färbung der Einsätze wird darüber hinaus Streustrahlung vermieden.

Der Extinktionsverstärker ist bei allen photometrischen Messungen von Mikrotiterplatten einsetzbar, insbesondere bei der Auswertung von Enzym-Immunoassays mittels ELISA-Reader.